

Método para la evaluación de calidad de planta y estado micorrícico de plantas de *Quercus ilex* inoculadas con *Tuber melanosporum*. Fischer y Colinas (1996), revisión enero de 2014.

..... página 2

Method for the evaluation of plant quality and mycorrhizal status of *Quercus ilex* seedlings inoculated with *Tuber melanosporum*. Fischer and Colinas (1996), revision January 2014.

..... page 10

Método para la evaluación de calidad de planta y estado micorrícico de plantas de *Quercus ilex* inoculadas con *Tuber melanosporum*. Fischer y Colinas (1996), revisión enero de 2014.

1. Identificación del lote

La certificación comienza con la documentación de la homogeneidad y la garantía fitosanitaria vegetal según lo establecido por las normas nacionales. Todas las plantas incluidas en un lote determinado tendrán las siguientes condiciones en común:

- Procedencia de la semilla
- Procedencia del inóculo y método de inoculación
- Fecha de inoculación
- Sustrato
- Condiciones del vivero

2. Toma de muestras

De cada lote se seleccionan 12 plantas.

- Las plantas serán seleccionadas mediante números aleatorios asignados por el organismo evaluador.
- Las plantas serán transportados al laboratorio y mantenidas en condiciones adecuadas hasta ser examinadas.
- Las plantas deben ser evaluadas en las 2 semanas siguientes a la fecha de selección.

3. Eliminación del sustrato

Las plantas se extraen cuidadosamente del contenedor con el sistema radicular intacto y el procedimiento de limpieza es el siguiente:

- Las plantas se colocan en un baño de agua fría para humedecer todo el cepellón y el sustrato se retira suavemente para preservar las raíces tróficas por agitación suave en el baño de agua o en una cámara de ultrasonidos.
- El agua se cambia con la frecuencia necesaria, evitando la presión directa de un chorro de agua del grifo sobre las raíces.
- El sustrato restante puede ser retirado a la lupa binocular con pinzas.

4. Evaluación de la calidad de la planta

Las 12 plantas se evalúan para determinar la calidad de planta en base a criterios oficiales (Anexo 1).

- Se mide la altura del tallo, el diámetro del cuello de raíz, y la profundidad de la raíz.
- Los resultados de calidad de las plantas se registran en la Hoja de Datos de Planta (Anexo 2).

5. Evaluación preliminar en la lupa binocular

El sistema radicular entero de cada planta se examina en la lupa binocular para evaluar los siguientes parámetros:

- La abundancia de raíces tróficas
- Abundancia y distribución general de las micorrizas
- Aspecto general del desarrollo, el color y la morfología de las micorrizas de *Tuber melanosporum*
- La presencia de contaminantes (micorrizas de otros hongos).
- Presencia de patógenos de raíz
- Las micorrizas de identificación dudosa se deben extraer y hacer una preparación para su examen morfológico al microscopio.
- Las micorrizas que son similares a *T. melanosporum* y cuya identidad no se puede confirmar morfológicamente, se someterán a identificación molecular para descartar la presencia de *T. indicum* y *T. brumale*.

Los resultados de la evaluación preliminar se documentan en la Hoja de Datos de Planta (Anexo 2).

Los criterios para continuar con la evaluación de las plantas de la muestra en esta etapa son los siguientes:

- a) Mínimo de 900 raíces tróficas sanas por planta
- b) Al menos 10% del sistema radicular colonizado por *T. melanosporum*
- c) No más del 50% de las micorrizas pertenecen a hongos contaminantes
- d) Ausencia completa de micorrizas de hongos del género *Tuber* distintos de *T. melanosporum*

6. Confirmación molecular de *Tuber melanosporum*

Las muestras de micorrizas se toman durante la evaluación preliminar y se pueden congelar a -20 ° C hasta disponer de muestras de varios lotes con el fin de maximizar la eficiencia de las extracciones y amplificaciones de ADN y su visualización en geles.

- De cada una de las 12 plantas de cada lote, se toman 1 o 2 micorrizas de cada morfotipo carente de cystidia o de apariencia dudosa y se colocan en un tubo Eppendorf para la posterior extracción de ADN. En un tubo Eppendorf se pueden poner micorrizas de 1 a 3 plantas hasta un máximo de 25 micorrizas por tubo.
- Las extracciones de ADN se llevan a cabo utilizando el kit Omega EZNA fungal DNA Mini Kit, siguiendo el Protocolo Corto C de las instrucciones del fabricante.
- La PCR se realiza con el kit Illustra™ PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (tubos de 25µl) y los siguientes cebadores específicos multiplex de cada especie: ITS4LNG, ITSb, ITSML y ITSCHCH (Paolocci et al 1999, FEMS Microb Ecol 28: 23). Los controles positivos consisten en extracciones de ADN de esporocarpos de *T. melanosporum*, *T. brumale* y *T. indicum* y se incluyen en cada lote de amplificaciones.
- Los amplicones de PCR se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con GelRed y los resultados se visualizan en un transiluminador UV.

7. Cuantificación de las micorrizas y el total de raíces tróficas

Si todas las 12 plantas de la muestra del lote pasan la evaluación preliminar, una muestra aleatoria del total de las raíces tróficas de la primera planta se contará de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- Eliminar el tallo.
- Si el sistema radicular es muy grande, el analista puede cortarlo en dos o en cuatro secciones iguales, en sentido longitudinal, seleccionar aleatoriamente una sección para contar y indicar en la Hoja de Datos de Planta (Porc. Sist. Rad.), la porción del sistema radicular utilizado (1.0, 0.5 o 0.25) .
- Cortar con cuidado las raíces en segmentos de 2-3 cm y colocarlos de manera uniforme sobre una cuadrícula de 1 cm x 1 cm (Anexo 3) en una bandeja poco profunda con agua. Todos los segmentos deben estar dentro de la cuadrícula. La cuadrícula contiene 4 grupos de cuadrados, iguales en número, cada grupo de un color diferente y dispuestos al azar en la cuadrícula. El analista elegirá aleatoriamente un color para el conteo y procederá a colocar la bandeja en la lupa binocular.
- Distribuir los segmentos de raíz de manera uniforme sobre toda la superficie de la rejilla, y comenzar el conteo por estados de todas las raíces tróficas dentro de un cuadrado del color seleccionado.
- En cada cuadrado contar las raíces correspondientes a los tres estados micorrícicos siguientes de manera que:

T = número de micorrizas de *T. melanosporum*

N = número de raíces tróficas no colonizadas o senescentes

**C = número de micorrizas no formadas por *T. melanosporum*
(contaminantes)**

- Se introduce el número de puntas de raíces de cada categoría en la Hoja de Datos de Planta, incluso si el número es cero. (Anexo 2). Después de introducir los datos de un cuadrado, se mueve con cuidado la bandeja para visualizar el siguiente cuadrado del color seleccionado para contar.
- Continuar el conteo de cuadrados por categorías hasta que se hayan contado al menos 250 raíces tróficas.

8. Estimación de proporciones, del número de raíces tróficas y de micorrizas

En base los 250 (o más) ápices, se realizan los siguientes cálculos para cada planta que se debn multiplicar por el inverso de la proporción del sistema radical utilizado:

- Número total de raíces tróficas (AT)
- Proporción de *T. melanosporum*: $PT = T / (N + C)$
- Proporción de Contaminantes: $PC = C / T$
- Número de micorrizas de *T. melanosporum* (MT)

9. Estimación de intervalos de confianza para las proporciones de *T. melanosporum* (PT) y contaminantes (PC), y para el número de raíces tróficas totales (AT) y micorrizas de *T. melanosporum* (MT) para el lote de planta.

Después de completar las cuantificaciones de raíces tróficas y los cálculos de PT, PC, AT y MT de 5 plantas, el analista estima los intervalos de confianza del 95% para el lote.

Frecuentemente es necesario usar transformaciones logarítmicas para cumplir con el requisito de normalidad.

- Si se cumplen los criterios sobre los intervalos de confianza (IC) para PT y PC, y el número de raíces finas totales (AT), el lote puede considerarse ideal, sin más conteo de raíces.
- Si no se cumplen los criterios, el analista seguirá contando raíces de las plantas que quedan hasta que se cumplan los criterios o haya contado la 12^a.
- Si las plantas son homogéneas y la amplitud del intervalo de confianza para el PT se ha reducido, pero el lote no cumple con los requisitos, el analista puede concluir el conteo antes de la planta 12. Los valores y CI para PT, PC, AT y MT calculado para las plantas contadas hasta ese punto serán consideradas las estimaciones para el lote.
- Las estimaciones se presentan con intervalos de confianza del 95%.

10. Criterios de idoneidad para truficultura

El lote será considerado idóneo para la truficultura cuando se cumplan los siguientes requisitos:

- a) Todas las plantas de la muestra han cumplido los criterios de calidad de planta y de la primera observación.
- b) El límite inferior del intervalo de confianza del número de raíces tróficas de las plantas del lote debe ser mayor de 1800.
- c) No debe haber ninguna planta que tenga una PT (Proporción de raíces tróficas colonizadas por *T. melanosporum*) menor de 0.11 (10%).
- d) No debe haber ninguna planta que tenga una PC (Proporción de micorrizas de hongos distintos de *Tuber melanosporum*) mayor de 1 (más del 50% de micorrizas de contaminantes).
- e) El límite inferior del intervalo de confianza de PT del lote debe ser mayor de 0.50 (33% de colonización por *T. melanosporum*).
- f) El límite superior del intervalo de confianza de PC del lote debe ser menor de 0.33 (el número de micorrizas de contaminantes de raíces tróficas debe ser inferior al 25% del número de micorrizas de *T. melanosporum*).
- g) No debe haber ninguna planta con micorrizas de una especie de *Tuber* distinta de *T. melanosporum*.
- h) Si el límite inferior del intervalo de confianza para PT no es mayor que 0,50 porque el número de ápices tróficos es muy alto en proporción al número de micorrizas y PC es muy bajo, el analista podría considerar la planta o el lote como excelente si el límite inferior del IC del número total de micorrizas de *T. melanosporum* es mayor de 600, que es el 33% de 1800, la cantidad más baja de micorrizas de *T. melanosporum* que una planta puede tener de acuerdo con b) y e).

Anexo 1.

Criterios de evaluación de calidad de la planta para *Quercus ilex* contenedor

Según el Anexo VII, Parte E del Real Decreto 289/2003 sobre comercialización de los materiales forestales de reproducción. Las plantas no se comercializarán si el 95% de cada lote no es de calidad cabal y comercial. No se considerarán de calidad cabal y comercial las plantas que presenten algunos de los siguientes defectos:

- a) Heridas distintas de las causadas por la poda o heridas debidas a los daños de arranque.
- b) Ausencia de yemas susceptibles de producir un brote apical.
- c) Tallos múltiples.
- d) Sistema radicular deformado ⁽¹⁾.
- e) Signos de desecación, recalentamiento, enmohecimiento, podredumbre o daños causados por organismos nocivos.
- f) Desequilibrio entre la parte aérea y la parte radical.
- g) Dimensiones por edad:
 - a. Plantas de 1 año con altura mínima de 8 cm, altura máxima de 30 cm y un diámetro del cuello de raíz mínimo de 2 mm;
 - b. Plantas de 2 años con altura mínima de 15 cm, altura máxima de 50 cm y el diámetro del cuello raíz mínimo de 3 mm.

A estos criterios de calidad hemos añadido el siguiente requisito:

- h) Las plantas deben tener un mínimo de 900 raíces tróficas.

⁽¹⁾ Hemos interpretado este requisito según Peñuelas 1993 (Calidad de la planta forestal para el plan de reforestación de tierras agrícolas. Montes, 33: 84-97) como: Se considera un sistema radical bien formado cuando la raíz pivotante está bien repicada sin bucles o ángulos inferiores a 110°.

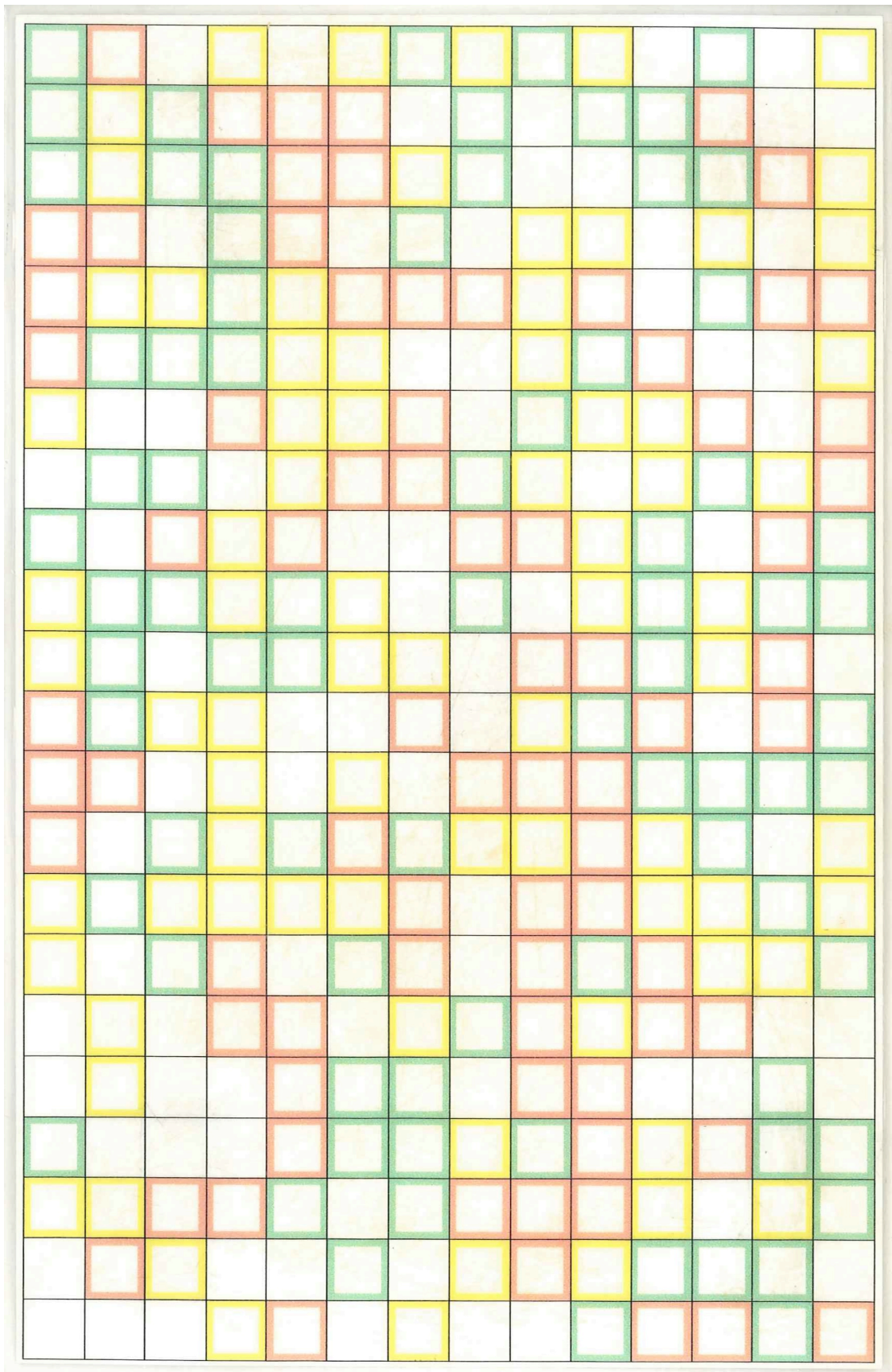
Anexo 2.

Hoja de datos de planta

Evaluación de plantas de <i>Q. ilex</i> inoculadas con <i>T. melanoporum</i>									
Planta Nº:		Vivero:		Fecha de siembra:					
Fecha:		Lote:		Fecha de inoculación:					
Calidad de planta									
Heridas	Yemas apicales	Tallos múltiples	Deform Rad	Sanidad	Equilibrio	Dimensiones	Altura tallo	Diam cuello	Long. Cep
Primera Observación					Comentario				
Min. 900 raíces tróficas	Colonización Tuber >10%	Contaminantes < 50%	Sp. otros Tuber	Sp. otros hongos					
Conteo raíces tróficas					Comentario				
Porc. Sist. Rad.									
Quadro	<i>T. mel.</i>	No Mic.	Contamin.	Total					
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									
19									
20									
21									
22									
23									
24									
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
Sumas:	T=	N=	C=						
TOTAL =	PT = T/N+C =								
	PC = C/T =			AT=					

Anexo 3.

Cuadrícula para conteo de raíces tróficas.



Referencia:

Fischer, C. y Colinas, C. 1996. Método de control de planta de *Quercus ilex* inoculada con *Tuber melanosporum*. En "Puesta a punto de un método de control de planta de *Quercus ilex* inoculada con *Tuber melanosporum*". Informe para el Centro de Investigación Forestal de Valonsadero, Junta de Castilla y León. 66 pag.

Method for the evaluation of plant quality and mycorrhizal status of *Quercus ilex* seedlings inoculated with *Tuber melanosporum*. Fischer and Colinas (1996), revision January 2014.

1. Identification of plant lot

Certification begins with the documentation of homogeneity and guarantee of plant health as set by national standards. All plants within a given lot will have the following conditions in common:

- Seed source
- Inoculum source and method of inoculation
- Date of inoculation
- Plant substrate
- Nursery conditions

2. Selection of sample plants

From each lot 12 plants are selected.

- The plants will be selected based on a random number assignment by the evaluating agency.
- Plants will be transported to the laboratory and maintained in adequate conditions prior to examination.
- Plants should be evaluated within 2 weeks since the date of selection.

3. Removal of soil or potting substrate

Plants are carefully removed from the container with the root system intact and the cleaning procedure is as follows:

- Plants are placed in a cool water bath to moisten the entire root system and substrate is gently removed to preserve the fine root tips by gentle agitation in the water bath or ultra-sonic chamber.
- The water is changed as frequently as necessary while avoiding direct pressure on the roots from a stream of faucet water.
- The remaining substrate may be removed at the binocular microscope with tweezers.

4. Evaluation of plant quality

All 12 plants are evaluated for seedling quality based on official criteria (Annex1).

- Measurements are made for stem height, root collar diameter, and root depth.
- Results of plant quality are documented on the Plant Data Sheet (Annex 2).

5. Preliminary evaluation at the binocular microscope

The entire root system of each plant is examined at the binocular microscope to assess the following parameters:

- The abundance of fine roots
- Overall abundance and distribution of mycorrhizae
- General developmental appearance, color and morphology of the mycorrhizae of *Tuber melanosporum*
- Presence of contaminants (mycorrhizae of other fungi)
- Presence of root pathogens
- Mycorrhizae of doubtful identification should be selected and prepared on slides for microscopic examination of morphology.
- Mycorrhizae that are similar to *T. melanosporum*, whose identity cannot be confirmed morphologically, will be submitted to molecular identification to rule out the presence of *T. indicum* and *T. brumale*.

Results of the preliminary evaluation are documented on the Plant Data Sheet (Annex 2). The Criteria to proceed with the evaluation of the sample seedlings at this stage are the following:

- a) Minimum of 900 healthy fine roots per plant
- b) At least 10% of the root system is colonized by *T. melanosporum*
- c) No more than 50% of the mycorrhizae present are those of contaminating fungi
- d) Complete absence of mycorrhizae of fungi belonging to the genus *Tuber* other than *T. melanosporum*

6. Molecular Confirmation of *Tuber melanosporum*

Samples of mycorrhizae are collected during the preliminary evaluation and may be frozen at -20° C until several lot samples are available in order to maximize efficient processing of DNA extractions, PCRs and gel preparations.

- From each of the 12 plants in a lot sample, 1 or 2 mycorrhizae from each morphotype lacking in cystidia or of doubtful appearance are placed in an Eppendorf tube for DNA extraction. In a single Eppendorf, mycorrhizae from 1 - 3 plants are included to a maximum of 25 mycorrhizae per tube.
- DNA extractions are carried-out using the Omega EZNA fungal DNA Mini Kit, following the Short Protocol C of the manufacturer's instructions.
- PCR is performed using the illustra™ PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (25µl tubes) and the species-specific, multiplex primers ITS4LNG, ITSB, ITSML and ITSCHCH (Paolocci et al. 1999, FEMS Microb Ecol 28: 23). Positive controls using DNA extractions of *T. melanosporum*, *T. brumale* and *T. indicum* sporocarps are included in each PCR batch.
- PCR amplicons are run through an electrophoresis on 2% agarose gel with GelRed and results are visualized via the UV transilluminator.

7. Quantification of mycorrhizae and total fine root tips

If all 12 plants of the lot sample pass the preliminary evaluation, a randomized sample of the total fine roots of the first plant will be counted according to the following procedure:

- Remove the stem from the roots.
- If the root system is extremely large, the analyst can cut the system in equal halves or fourths, longitudinally, randomly selecting the section for counting and indicating on the Plant Data Sheet (Vol. Root system), the portion of the root system used (1.0, 0.5 or 0.25).
- Carefully cut the roots in 2-3 cm segments and place them evenly over a 1 cm x 1 cm grid (Annex 3) in a shallow tray of water. The grid contains 4 groups of squares, equal in number, each group of a different color and arranged randomly over the entire grid. All segments must be within the grid. The analyst will randomly choose a color for the count and proceed to position the tray at the binocular microscope.
- Spread the root segments evenly over the entire surface of the grid, and begin counting, according to status, all of the root tips within a square of the selected color.
- For each square, count the number of root tips that correspond to the following 3 mycorrhizal statuses such that:

T = number of *T. melanosporum* mycorrhizae

N = number of non-colonized or senescent root tips

C = number of non- *T. melanosporum* mycorrhizae (contaminants)

- The number of root tips for each status is entered in the Plant Data Sheet even if the number is zero. (Annex 2). After entering the data for one square, carefully move the tray to visualize the subsequent square of the selected color for the next count.
- Continue counting according to status until at least 250 root tips have been counted.

8. Estimation of proportions, numbers of fine root tips and mycorrhizae

Based on the 250 (or more) counts, the following calculations are made for each plant that must be multiplied by the inverse of the proportion of the root system used:

- Total number of fine root tips (AT)
- Proportion of *T. melanosporum*: $PT = T / (N + C)$
- Proportion of Contaminants: $PC = C / T$
- Number of *T. melanosporum* mycorrhizae (MT)

9. Estimation of Confidence Intervals for the proportions of *T. melanosporum* (PT) and contaminants (PC), and for numbers of total fine roots (AT) and *T. melanosporum* mycorrhizae (MT) for the plant lot.

After completing the root tip quantifications and calculations for PT, PC, AT and MT for 5 plants, the analyst will estimate the 95% confidence intervals for the lot. Log transformations are usually needed to meet the normality requirement.

- If the criteria are met, based on the Confidence Intervals (CI) for PT and PC and the number of total fine roots (AT), the lot can be deemed ideal without further quantification of root tips.
- If the criteria are not met, the analyst will continue to count root tips from the remaining plants until either the criteria are met or the 12th plant has been included.
- If the plants are homogenous and the amplitude of the CI for PT has narrowed but the lot does not meet the requirements, the analyst can determine to conclude the count before the 12th plant. The values and CI for PT, PC, AT and MT calculated for the plants counted at that point will be considered the estimates for the lot.
- The estimates are reported with 95% Confidence Intervals.

10. Criteria of excellence for plants for truffle cultivation

The lot is considered ideal for truffle cultivation when the following criteria are met:

- a) All plants in the sample have met the plant quality criteria as well as the criteria of the preliminary observation.
- b) The lower limit of the Confidence Interval for the number of total fine roots for the lot is greater than 1800.
- c) No single plant within the sample has a PT < 0.11 (less than 10% colonization by *T. melanosporum*).
- d) No single plant within the sample has a PC > 1.0 (greater than 50% of mycorrhizae are contaminants).
- e) The lower limit for the Confidence Interval for PT > 0.50 (greater than 33% colonization by *T. melanosporum*).
- f) The upper limit for the Confidence Interval for PC < 0.33 (The number of contaminating mycorrhizae is less than 25% of number of *T. melanosporum* mycorrhizae).
- g) No single plant within the sample has been colonized by species of *Tuber* other than *T. melanosporum*.
- h) If the Lower Limit of the CI for PT is not greater than 0.50 because the number of fine root tips is extremely high in proportion to mycorrhizae and PC is very low, the analyst could consider the plant/lot excellent if the lower limit of the CI of total number of *T. melanosporum* mycorrhizae is larger than 600, which is 33% of 1800, the lowest amount of *T. melanosporum* mycorrhizae a plant can have according to b) and e).

Annex 1.

Criteria for evaluating plant quality of *Quercus ilex* containerized seedlings

According to Annex VII, Part E of the Spanish law Real Decreto 289/2003 regarding the commercialization of forestry materials used in reforestation, at least 95% of the plants within a lot must meet standards of quality in order for the lot to be commercially legal. Plants are considered unqualified if they present the following defects:

- a) Wounds other than those caused by pruning or extraction.
- b) Absence of apical buds.
- c) Multiple stems.
- d) Deformations of the root system ⁽¹⁾.
- e) Signs of desiccation, overheating, mold, rot or damage due to pathogenic organisms.
- f) Unbalanced dimensions of the shoot and root systems.
- g) Height and root collar dimensions are based on seedling age:
 - a. 1-year seedling: minimum height=8 cm, maximum height= 30 cm; root collar diameter minimum= 2 mm,
 - b. 2-year seedling: minimum height= 15 cm, maximum height= 50 cm and root collar diameter minimum= 3 mm.

Additionally we have included the following requirement:

- h) Plants should have a minimum of 900 fine roots.

⁽¹⁾ We have interpreted this requirement, according to Peñuelas 1993 (Calidad de la planta forestal para el plan de reforestacion de tierras agricolas. Montes, 33: 84-97), as: The root system is well-formed if the tap root has multiple branching without knots or bends with angles of less than 110°.

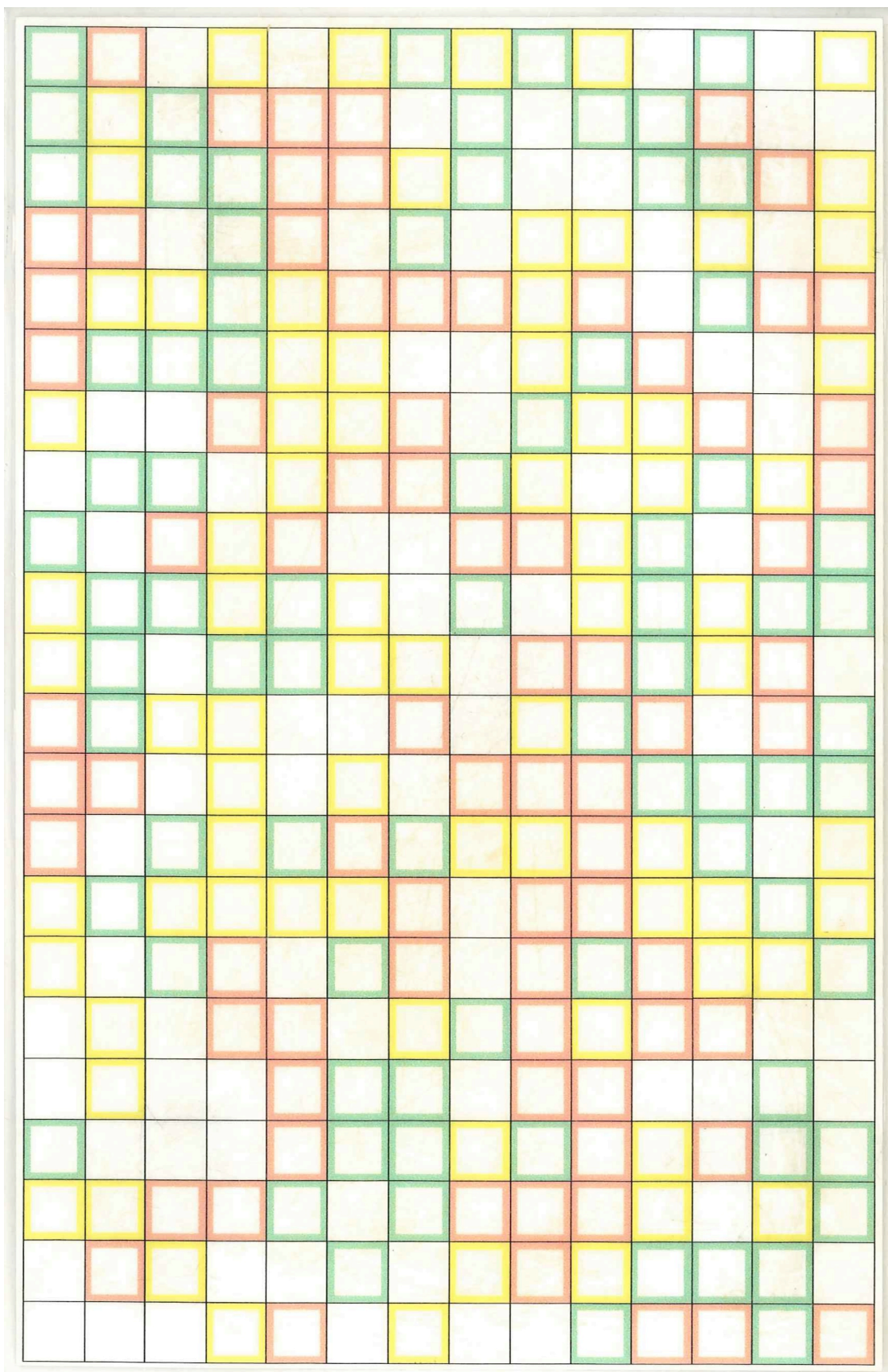
Annex 2.

Plant Data Sheet

Evaluation of <i>Q. ilex</i> plants inoculated with <i>T. melanosporum</i>									
Plant N°:		Nursery:		Date of planting:		Age			
Date:		Lot:		Date of inoculation:					
Plant quality									
Wounds	Apical buds	Single stem	Root formation	Health	Root:Shoot balance	Dimensions	Shoot height	Root Collar	Root length
Preliminary Observation					Comments				
Min. 900 fine roots	Colonization Tuber >10%	Contaminants < 50%	Other Tuber species	Other fungi sp.					
Root tip Count		Vol. Root system =							
Square	<i>T. mel.</i>	Non Mycorrhizal	Contamin.	Total	Comments				
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									
19									
20									
21									
22									
23									
24									
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
Sums:	T=	N=	C=						
TOTAL	PT	= T/N+C =							
	PC	= C/T =			AT=				

Anex 3.

Grid for root tip count.



Reference:

Fischer, C. y Colinas, C. 1996. Método de control de planta de *Quercus ilex* inoculada con *Tuber melanosporum*. En "Puesta a punto de un método de control de planta de *Quercus ilex* inoculada con *Tuber melanosporum*". Informe para el Centro de Investigación Forestal de Valonsadero, Junta de Castilla y León. 66 pag.